昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，October 2002，45（5）：578－582 ISSN 0454-6296

森林革蜱、草原革蜱感染和经期传播莱姆病螺旋体的实验研究

孙 毅，许荣满*，郭天宇，张泮河，曹务春

（军事医学科学院微生物流行病研究所，北京 100071）

摘要：以实验室培育的非感染森林革蜱 *Dermacentor silvarum*、草原革蜱 *D. nuttalli* 刺叮人工感染 21 天后的阳性 KM 鼠，利用分离培养和 PCR 方法检测蜱对螺旋体的保持能力以及体内螺旋体对敏感动物的感染能力。结果如下：非感染幼蜱均可以通过吸血获得莱姆病螺旋体，饱血森林革蜱和草原革蜱幼蜱 PCR 阳性率均为 50.0%而分离阳性率都为 20.0%。饱血脱落后，这些幼蜱只能在饱血后 2 天内分离到莱姆病螺旋体。PCR 检测阳性也只能持续到 4 天，均不能跨越蜕皮阶段。蜕化为若蜱后，若蜱以及分别受到这些若蜱刺叮的 KM 鼠均未发现阳性感染。非感染若蜱吸食感染的 KM 鼠后，饱血森林革蜱和草原革蜱获得了莱姆病螺旋体，PCR 检测阳性率分别为 50.0%和 20.0%。分离阳性率分别达到 33.3%和 60.0%。这些若蜱分别于饱血后 2 天和 3 天可以分离到莱姆病螺旋体，PCR 扩增阳性也只能分别持续到饱血后 4 天和 6 天，均不能跨越蜕皮阶段；蜕化为成蜱后，成蜱以及受到它们攻击的 KM 鼠均未获阳性检测结果。同种蜱不同地理株在感染和保持莱姆病螺旋体的能力上也没有差异。森林革蜱、草原革蜱的幼蜱和若蜱虽可以吸血感染但均不具备经期传播莱姆病螺旋体 *Borrelia garinii* CHNM4 的能力，作为莱姆病媒介的可能性不大。

关键词：莱姆病；实验经期传播；动物模型；森林革蜱；草原革蜱

中图分类号：R384.4 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）05-0578-05

Failure to transmit Lyme spirochetes transstadially in *Dermacentor silvarum* and *D. nuttalli*（Acari：Ixodidae）

SUN Yi，XU Rong-Man*，GUO Tian-Yu，ZHANG Pan-He，CAO Wu-Chun（Institute of Microbiology & Epidemiology，Academy of Military Medical Sciences，Beijing 100071，China）

Abstract: To determine the principal vectors of Lyme disease in North China，the capability of *Dermacentor silvarum* and *D. nuttalli* to transmit Lyme spirochetes transstadially was estimated under laboratory conditions. Spirochete-free larval ticks were found to acquire *Borrelia garinii* if allowed to feed on infected KM mice. PCR tests indicated that 50% of such larvae subsequently became infected by *B. garinii*. However，cultivation revealed that only about 20.0% of these larva harbored live spirochetes. Spirochetes were detectable in *D. silvarum* and *D. nuttalli* larvae up to 8 days after ingestion but remained alive for only 2 days after ingestion. All engorged larvae no longer contained live spirochetes by the time they reached the nymph stage. PCR and cultivation indicated that both newly emerged nymphs and KM mice parasitised by these nymphs were negative for *B. garinii*. Spirochete-free nymph ticks could also acquire *B. garinii* by feeding on infected KM mice. PCR indicated that 50% of such nymphs became infected. Cultivation of spirochetes from engorged nymphs indicated infection rates of 33.3% and 60.0% respectively. Spirochetes were detectible for between 4 and 6 days but remained alive for only 2－3 days after ingestion. None of the engorged nymphs contained live spirochetes by the time they reached the adult stage. After molting，neither newly emerged adults or KM mice parasitized by them were found to be infected. The same tick species collected from different sites were similarly incapable of maintaining live Lyme spirochetes. We conclude that *D. silvarum* and *D. nuttalli* are unable to transmit infectious *B. garinii* to subsequent developmental stages. The presence of spirochetes in *D. silvarum* and *D. nuttalli* may be tied to co-feeding with *Ixodes persulcatus*.

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39970656）

第一作者简介：孙毅，男，1973 年 10 月生，博士，助研，从事蜱螨及相关疾病研究，E-mail：sunyi@nic.bmi.ac.cn

* 通讯作者 Author for correspondence

收稿日期 Received：2001-11-12；接受日期 Accepted：2002-06-19

Key words: Lyme disease; experimental transstadial-transmission; animal model; *Dermacentor silvarum*; *Dermacentor nuttalli*

我国的莱姆病自然疫源地的流行病学调查研究表明，国内 20 多个省、市、自治区均有该病的分布，年发病例约万余（万康林等，1998）。证明了内蒙古、新疆以及东北林区存在莱姆病自然疫源地，全沟硬蜱 *Ixodes persulcatus* 为主要传播媒介（艾承绪等，1987），同时也发现了甘肃、宁夏等省区人群感染有莱姆病（万康林等，1998）。但我国的全沟硬蜱仅分布于六盘山、燕山山脉以北的山地林区，其他林区莱姆病的传播媒介尚不清楚。针对这一问题，国内展开了较为广泛的研究，发现森林革蜱 *Dermacentor silvarum* 和草原革蜱 *D. nuttalli* 都具有较高的阳性感染率，并且还从森林革蜱和草原革蜱中分离到莱姆病螺旋体。这两种蜱前者主要分布在我国华北等北部山区林地，后者则在我国西北及部分北部林区具优势地位，对人畜都具有很强的攻击性，成为这些地区莱姆病的传播媒介可能性很大。然而，一个媒介生物的认定仅仅依靠分离或检测到自然感染病原体显然是不够的，还需要实验传播能力、生态学等方面的证据。媒介蜱类对莱姆病的传播可分为经卵传播和经期传播（即经过不同发育期后亦携带感染性病原体），其中，经卵传播的能力较弱，而经期传播率较高，经期传播成为蜱媒在莱姆病传播中发挥主要作用的传播方式。为了分析这些蜱种作为莱姆病媒介的可能性，明确它们的媒介地位和作用，我们通过感染和经期传播实验探讨它们传播莱姆病螺旋体的可能性。

1　材料与方法

1.1　材料

森林革蜱于 2000 年采自内蒙古大兴安岭乌尔旗汉林区和北京妙峰山。草原革蜱于 2000 年采自新疆精河地区。莱姆病螺旋体菌株 *Borrelia garinii* CHNM4 于 1999 年自内蒙古采集的全沟硬蜱中分离（孙毅等，2002a）。昆明小鼠（简称 KM 鼠）由本院实验动物中心提供。

1.2　方法

1.2.1　森林革蜱和草原革蜱非感染种群的建立：森林革蜱和草原革蜱非感染幼蜱种群的建立参照孙毅等（2002b）的方法进行，以此幼蜱种群刺叮正常昆明小鼠蜕化形成的若蜱为非感染若蜱种群。

1.2.2　莱姆病人工宿主动物模型的建立：人工宿主动物模型的建立参照孙毅等（2002c）的方法进行，以耳组织分离为阳性的 KM 鼠为人工宿主动物模型。

1.2.3　经期传播实验：以森林革蜱和草原革蜱的非感染种群分别攻击阳性 KM 鼠，待饱血后，置于底部垫有湿润细沙和滤纸的试管中，幼蜱分别于饱血后 1 天、2 天、4 天、8 天和 16 天，若蜱分别于饱血后 1 天、2 天、4 天、8 天、12 天、16 天、20 天和 24 天，采用 PCR 和分离的方法进行检测并观察蜱的存活与蜕皮情况。待其全部蜕化后，分成两部分，一部分若蜱于蜕化后 1 个月内采用分离和 PCR 方法检测，另一部分若蜱攻击正常昆明小鼠，以叮咬小鼠时间大于 72 h 为有效攻击，每只昆明小鼠获得有效攻击蜱数不低于 5，逐日观察被叮咬小鼠的体表症状，28 天后采小鼠心血致死，取少量心血进行分离培养和血清抗体检测，并解剖观察，取脾脏、膀胱、耳叶组织进行分离和 PCR 检测。

饲养条件：25 ± 1℃，RH（95 ± 5）%，光周期 12 h∶12 h（L∶D）。

1.2.4　检测方法：将蜱纵切为两半，分别进行分离和 PCR 检测，以两种检测结果均呈阳性者为阳性结果。动物组织也分成两部分，一部分采用动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 模板后进行 PCR 扩增检测，另一部分采用分离培养方法进行检测。具体的分离和 PCR 检测方法参照 Sun 等（2001）进行。

1.2.5　莱姆病螺旋体在传播中的稳定性：将实验中的阳性标本，采用 16S rRNA 通用引物进行扩增和序列测定（孙毅等，2002a）。

1.2.6　数据分析：采用 SAS 统计软件包进行。

2　结果与分析

2.1　森林革蜱感染和传播莱姆病螺旋体的可能性

2.1.1　幼蜱到若蜱：采用森林革蜱非感染幼蜱攻击已感染的 KM 鼠，获得饱血幼蜱。从饱血脱落后起，在第 1、2、4、8 和 16 天检测蜱感染莱姆病螺旋体的情况。PCR 检测结果表明，森林革蜱内蒙地理株和北京地理株叮咬已感染 KM 鼠后，均可获得

莱姆病螺旋体，阳性率分别为40.0%（12/30）和50.0%（15/30）。随着饱血后时间的变化，蜱体内的莱姆病螺旋体逐渐崩解，阳性率降低，至第4天，感染率分别降低到5.0%（1/20）和0（0/20），到第8天森林革蜱蜕化为若蜱后，所有检测结果均呈阴性；蜕化为若蜱8天后，再进行检测，仍未得到阳性检测结果。而分离方法检测的结果则与PCR方法不同，森林革蜱北京地理株和内蒙地理株只在饱血后第1～2天内有阳性分离结果，第1天阳性率分别为15.0%（3/20）和20.0%（6/30），至第2天，两地理株各只有1只森林革蜱分离结果呈阳性（$n_{内蒙古}=20$，$n_{北京}=30$），此后所有幼蜱和蜕变成的若蜱检测结果均为阴性（图1）。以蜕化形成若蜱攻击敏感KM鼠，也未获得阳性检测结果。可以看出，森林革蜱两地理株之间对莱姆病螺旋体的感染和保持能力基本一致。因此，森林革蜱两个地理株幼蜱虽可以感染但不具备经期传播莱姆病螺旋体的能力。

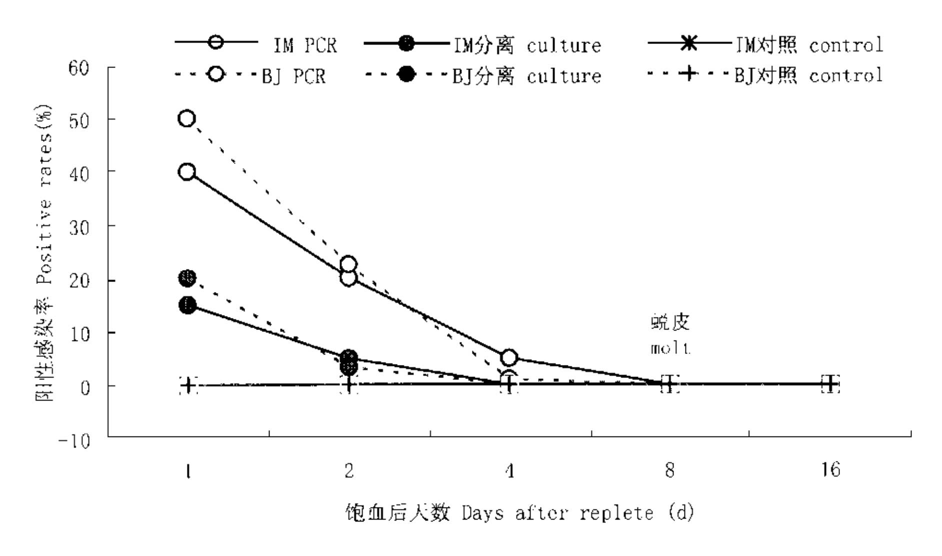


图1 森林革蜱幼蜱吸血到若蜱期间对莱姆病螺旋体的保持能力

Fig. 1 Infection rate of the Lyme spirochete *B. garinii* from the larvae to nymph stage of *D. silvarum*

BJ：北京种群 Beijing population；IM：内蒙古种群 Inner Mongolia population

2.1.2 若蜱到成蜱：采用类似的方法对若蜱的感染和经期传播进行实验研究。结果表明，森林革蜱内蒙种群和北京种群若蜱虽可以感染但仍不具备经期传播莱姆病螺旋体至成蜱的能力。若蜱的阳性感染率以及对莱姆病螺旋体的保持能力同幼蜱基本一致，若蜱也可以通过吸血感染莱姆病螺旋体但不能跨越蜕皮阶段。在饱血8天后直至蜕化为成蜱（饱血后12天）均未获得阳性检测结果。另外，以此饱血后而蜕化成的成蜱攻击敏感KM鼠，也未获得阳性检测结果（表1）。森林革蜱内蒙种群和北京种群若蜱之间未见显著差异。可见，森林革蜱的若蜱不具备经期传播至成蜱的能力。

表1 森林革蜱、草原革蜱感染和经期传播莱姆病螺旋体的情况

Table 1 Infectivity and transstadial transmission of the Lyme agent of *Dermacentor silvarum* and *D. nuttalli* after parasitizing infected KM mice

蜱种 Tick species	地理种群 Population	龄期 Instar	阳性感染率(%) Positive rates	对莱姆病螺旋体的保持时间(天) Duration of active Lyme spirochete infection(d)	敏感KM鼠被叮咬后的情况 Disease status of uninfected KM mice after parasitism by molted ticks
森林革蜱	内蒙古 Inner Mongolia	幼 larvae	40.0（15.0）	4（2）	未获感染 uninfected
D. silvarum	内蒙古 Inner Mongolia	若 nymph	50.0（30.0）	4（2）	未获感染 uninfected
	北京 Beijing	幼 larvae	50.0（20.0）	4（2）	未获感染 uninfected
	北京 Beijing	若 nymph	42.7（33.3）	4（2）	未获感染 uninfected
草原革蜱	新疆 Xinjiang	幼 larvae	50.0（20.0）	4（2）	未获感染 uninfected
D. nuttalli	新疆 Xinjiang	若 nymph	60.0（25.0）	6（3）	未获感染 uninfected

注：括号内数据为分离培养结果（In brackets：detected by cultivation with BSK II media）

2.2　草原革蜱传播莱姆病螺旋体的可能性

2.2.1　幼蜱到若蜱：采用同森林革蜱相同的方法，对草原革蜱感染和经期传播的能力进行系统观察。结果表明，采用 PCR 检测，草原革蜱叮咬已感染 KM 鼠后，可获得感染莱姆病螺旋体，阳性率达到 50.0%（20/40）。随着饱血后时间的变化，草原革蜱体内的莱姆病螺旋体逐渐崩解，感染阳性率降低，至第 4 天，感染率分别降低到 5.0%（2/40），此后，自第 8 天至第 16 天（饱血后 12 天蜕化为若蜱），所有草原革蜱均未有阳性检测结果，而分离培养检测草原革蜱体内活的莱姆病螺旋体则得到与 PCR 检测类似结果，只在饱血后第 1、2 天可从饱血草原革蜱体内分离到螺旋体，阳性率分别为 20.0%（4/20）和 5.0%（1/20）。此后所有分离检测结果均为阴性（表 1）。以蜕化形成的草原革蜱若蜱攻击敏感的 KM 鼠，也未有阳性检测结果。可见，草原革蜱幼蜱虽可以感染但不具备经期传播莱姆病螺旋体的能力。

2.2.2　若蜱到成蜱：采用同幼蜱类似的方法进行感染和连续检测，观察吸血若蜱以及蜕化成的成蜱携带莱姆病螺旋体的情况。检测表明，草原革蜱可通过吸血获得莱姆病螺旋体，与森林革蜱相比，阳性检出率较高，达到 60.0%（18/30）；草原革蜱对莱姆病螺旋体的保持能力较长，达到 6 天。但仍不能跨越蜕皮阶段（草原革蜱于饱血后 18 天蜕皮），此后所有草原革蜱的吸血若蜱以及蜕化形成的成蜱均未获得阳性分离结果（表 1）。以此饱血若蜱蜕化形成的成蜱攻击敏感 KM 鼠，所有小鼠的检测结果均呈阴性。可见，草原革蜱若蜱可以感染但不具备经期传播莱姆病螺旋体的能力。

2.3　森林革蜱、草原革蜱吸血获得感染莱姆病螺旋体的稳定性

在经期实验传播过程中，对培养螺旋体、KM 鼠、饱血幼蜱、饱血若蜱所感染莱姆病螺旋体的 16s 核糖体 DNA，进行扩增，获得了大小一致的扩增片段，大约为 800 bp；对这些片段进行序列同源性分析，结果它们的序列完全一致，说明森林革蜱、草原革蜱吸血获得了 *B. garinii* CHNM4，而非其他微生物。可知，森林革蜱、草原革蜱不具备经期传播莱姆病螺旋体的能力，森林革蜱不是莱姆病的主要传播媒介。

3　讨论

我国分布的革蜱主要包括森林革蜱、草原革蜱、中华革蜱 *D. sinicus*、银盾革蜱 *D. niveus*、阿坝革蜱 *D. abaensis*、西藏革蜱 *D. everestianus*、金泽革蜱 *D. auratus* 等。有关莱姆病螺旋体感染的革蜱有不少报道，但目前尚未有可靠的证据阐明他们的媒介地位和作用。本文旨在通过实验感染和传播研究，分析我国主要革蜱——森林革蜱、草原革蜱作为莱姆病媒介的可能性。结果表明，森林革蜱和草原革蜱虽可感染莱姆病螺旋体，但不具备经期传播能力，同样的试验则证明全沟硬蜱不仅能感染并且具备经期传播的能力（孙毅等，2001c），这说明全沟硬蜱与此两种革蜱对莱姆病螺旋体的传播能力差异显著，这种差异应归因于不同蜱种间的差异。

森林革蜱和草原革蜱可感染来自全沟硬蜱分离的螺旋体 *B. garinii*，说明硬蜱属所感染的莱姆病螺旋体也同样可以感染革蜱属成员，莱姆病螺旋体 *B. garinii* 对革蜱属和硬蜱属成员的感染能力没有明显的属种特异性。国外的研究也发现媒介蜱种肩板硬蜱所感染的莱姆病螺旋体对非媒介蜱种西方革蜱 *D. occidentalis*（Kramer and Beesley，1993；Lane *et al.*，1994）、安氏革蜱 *D. andersoni*（Mather and Mather，1990）、变异革蜱（Sander and Oliver，1995；Piesman and Happ，1997）以及白纹革蜱 *D. albipictus*（Magnarelli *et al.*，1986）都能感染（Piesman and Sinsky，1988；Oliver *et al.*，1995）。反之则不然，如从非媒介蜱种变异革蜱 *D. varialis* 分离到螺旋体 *B. lonestari*（Kocan *et al.*，1992）和安氏革蜱 *D. anderson* 分离到的螺旋体 *B. andersoni* 则均不能感染硬蜱属中的媒介蜱种肩板硬蜱 *I. scapularis* 和篦子硬蜱 *I. ricinus*。我国自森林革蜱和草原革蜱分离到的螺旋体能否感染媒介蜱种全沟硬蜱还有待实验证实，但从上述分析推测这种可能性很小。而其中 *B. lonestari* 与 *B. andersoni* 以及自我国革蜱中分离和/或检测到的螺旋体，目前均未有致病性的研究报道。由此可见，蜱类自然感染的伯氏疏螺旋体并非都是致病性的莱姆病螺旋体，仅依靠检测和分离结果不能说明蜱种的媒介地位。

另外，从叮咬吸血感染的过程来看，森林革蜱和草原革蜱在饱血 24 h 内获得的感染率同全沟硬蜱几乎是相同的，而关键在于不同蜱种对所感染螺旋体的保持能力差异悬殊。这表明莱姆病螺旋体对不同蜱种的感染力无显著差异，它们在传播能力上的差异可能体现在不同蜱种对所感染的螺旋体的应答反应的不同。变异革蜱在螺旋体感染 1 h 内血淋巴中血细胞明显激增，而媒介蜱种肩板硬蜱则没有

这种表现（John *et al*.，2000），这是否是媒介与非媒介蜱种传播莱姆病螺旋体能力差异的主要原因还有待证实。

西方革蜱和变异革蜱同样也不具备经期传播莱姆病螺旋体的能力，但当变异革蜱和肩板硬蜱共同叮咬感染宿主时，变异革蜱对螺旋体的保持能力显著增强（Sander and Oliver，1995）。这提示与肩板硬蜱共同吸血可以促进变异革蜱对莱姆病螺旋体的保持能力。其原因可能是媒介蜱种肩板硬蜱所产生的螺旋体调控物质进入宿主，再随吸血进入非媒介蜱种变异革蜱中肠，促进了螺旋体存活。我国森林革蜱和草原革蜱的分布同全沟硬蜱具有一定的重叠性，因此共同吸血感染极有可能。

参 考 文 献（References）

Ai C X，Wen Y X，Zhang Y G，Du Y，1987. A new tick-brone spirochete disease: Lyme disease was first found in Hailin County Heilongjiang Province. *Chinese Journal of Public Health*（*early version*），2（6）：6. [艾承绪，温玉欣，张永国，杜勇，1987. 黑龙江海林地区发现一种新的蜱传螺旋体病——莱姆病（Lyme disease）. 中国公共卫生（基础版），2（6）：6]

John R，Sonenshine D E，Hydres W L，2000. Response of tick *Dermacentor variabilis*（Acari：Ixodidae）to hemocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi*：（Spirochetales）. *J. Med. Entomol.*，37（2）：265－270.

Kocan A A，Mukolwe S W，Murphy G L，1992. Isolation of *Borrelia burgdorferi*（Spirochetales：Spirochaetaceae）from *Ixodes scapularis* and *Dermancentor albipictus* ticks（Acari：Ixodidiae）in Oklahomma. *J. Med. Entomol.*，29（3）：630－633.

Kramer V L，Beesley C，1993. Temporal and spatial distribution of *Ixodes pacificus*，*Dermancentor occidentalis*（Acari：Ixodidae）and prevalence of *Borrelia burgdorferi* in Contra casta，California. *J. Med. Entomol.*，30（5）：549－555.

Lane R S，Brown R N，Piesman J，1994. Vector competence of *Ixodes pacificus* and *Dermacentor occidentalis*（Acari：Ixodidae）for various isolates of Lyme disease spirochetes. *J. Med. Entomol.*，31（3）：417－424.

Magnarelli L A，Anderson J F，Anderson C S，1986. Spirochetes in ticks and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in white-tailed deer from Connecticut，New York State and North Carolina. *J. Wildlife Dis.*，22（1）：178－188.

Mather T N，Mather M E，1990. Intrinsic competence of three ixodid ticks（Acari：Ixodidae）as vectors of Lyme spirochetes. *J. Med. Entomol.*，27（4）：646－650.

Oliver J H Jr，Chandler F W，James A M，1995. Natural occurrence of the Lyme disease spirochetes *Borrelia burdgorferi* in cotton rats（*Sigmodon hispidus*）from Georgia and Florida. *J. Parasitol.*，81：30－36.

Piesman J，Happ C M，1997. Lyme disease spirochetes *Borrelia burgdorferi* to infected rodents and three species of human-biting ticks（black-legged tick，America dog tick，lone star tick）（Acari：Ixodidae）. *J. Med. Entomol.*，34（4）：451－456.

Piesman J，Sinsky R J，1988. Ability of *Ixodes scapularis*，*Dermacentor variablis*，*Amblyomma americanum* to acquire maintain and transmit Lyme disease spirochetes *Borrelia burdgorferi*. *J. Med. Entomol.*，25（3）：336－339.

Sander F H，Oliver J H Jr，1995. Evaluation of *Ixodes scapularis*，*Amblyomma americanum*，*Dermacentor variablis*（Acari：Ixodidae）from Georgia vectors of a Florida strain of Lyme disease spirochete *Borrelia burdgorferi*. *J. Med. Entomol.*，32（4）：402－406.

Sun Y，Guo T Y，Xu R M，Zhang P H，2001. Natural foci of Lyme disease in potential vector ticks and reservoir rodents in the Donglingshan Mountain area of Beijing. *Systematic & Application Acarology*，7：13－17.

Sun Y，Xu R M，Zhang P H，Guo T Y，Cao W C，2002a. Isolation of Lyme spirochetes from several potential ticks in China. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*，9（2）：114－119. [孙毅，许荣满，张泮河，郭天宇，曹务春，2002a. 我国常见蜱种的莱姆病螺旋体的分离与鉴定. 寄生虫与医学昆虫学报，9（2）：114－119]

Sun Y，Xu R M，Guo T Y，Zhang P H，Cao W C，2002b. Development of laboratory hosts of Lyme disease. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*，9（3）：160－167. [孙毅，许荣满，郭天宇，张泮河，曹务春，2002b. 莱姆病人工宿主动物模型的建立. 寄生虫与医学昆虫学报，9（3）：160－167]

Sun Y，Xu R M，Guo T Y，Zhang P H，Cao W C，2002c. Ability of *Ixodes persulcatus*（Acari：Ixodidae）transstadial transmission of tick－derived Lyme spirochetes *Borrelia garinii*. *Chinese Journal of Vector Bio & Control*，13（2）：89－92. [孙毅，许荣满，郭天宇，张泮河，曹务春，2002c. 全沟硬蜱经期传播莱姆病螺旋体的实验研究. 中国媒介生物学及控制杂志，13（2）：89－92]

Wan K L，Zhang Z F，Dou G L，Zhang J S，1998. Preliminary investigation of animal Lyme disease in 20 provinces，cities and autonomous regions in China. *Journal of Chinese Vector Biology and Control*，9（5）：366－371. [万康林，张哲夫，窦桂兰，张金生，1998. 中国20个省、区、市动物莱姆病的初步调查研究. 中国媒介生物学及控制杂志，9（5）：366－371]